

(19) 日本特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

第2882527号

(45) 発行日 平成11年(1999) 4月12日

(24) 登録日 平成11年(1999) 2月5日

(51) Int.Cl.

識別記号

FI

A01K 67/02

A01K 67/02

C12N 5/06

C12N 5/00

E

発明の数1(全 8 頁)

(21) 出願番号 特願昭62-330302

(22) 出願日 昭和62年(1987)12月28日

(65) 公開番号 特開昭63-291523

(43) 公開日 昭和63年(1988)11月29日

審査請求日 平成6年(1994)12月13日

審判番号 平0-13737

審判請求日 平成9年(1997)8月18日

(31) 優先権主張番号 948269

(32) 優先日 1988年12月31日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 113791

(32) 優先日 1987年10月27日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 99999999

エイビーエス・グローバル・インコーポ  
レーテッド

アメリカ合衆国ウイスコンシン州53532

デフォレスト・リバーロード6908

(72) 発明者 ニール・エル・ファースト

アメリカ合衆国ウイスコンシン州53705

マジソン・ハイムアベニュー 1717

(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

合議体

審判長 徳廣 正道

審判官 佐伯 裕子

審判官 郡山 順

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウシ胚増殖法

1

(57) 【特許請求の範囲】

1. (a) 受容用の卵母細胞から核染色体物質を除去することにより除核卵母細胞を形成し、

(b) 供与用のウシの割球を前記除核卵母細胞に隣接して置き、そして

(c) 前記供与用のウシの割球と前記除核卵母細胞を電気的に融合させる、

ことを特徴とする受容用の卵母細胞への供与用の細胞に由来する核の移植方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は一般にウシ胚の増殖法、好ましくは供与ウシ胚を除核受容卵母細胞に移植する方法に関する。

先行技術 (に関する記載)

動物育種の分野では遺伝的改良及び選択に関する技術

2

の進歩が絶えず求め続けられている。乳牛に特定しても、例えば遺伝的に優れた種牛及び人工受精を広範囲に用いて牛乳生産量を大幅に増加させてきた。今日乳牛は30年前と比較して殆ど2倍もの牛乳を生産する。更にクリーニングによって優れた又は遺伝的に操作した胚を増殖させて遺伝的改良が達成できる。

遺伝的に優れた系統の牛を生産するのに胚移植を行うことが、今や実際に受け入れられるようになった。胚のクローニングとクローン化した胚の移植が可能になっ

て、多数の遺伝的に同一な動物の生産が可能になる。ウシ胚は現在発育中の胚を外科的に二分することで漸くクローニング出来る。しかしこの方法によって製造できるクローンの数は2ないし4個に限られ、それ以上になると二分した胚は成育不能になる。多細胞胚から複数の胚単一細胞への核移植をすればこの限界は乗り越えられる可

能性があり、多数の同一動物の生産が可能になる。

核移植は1939年、Comandon及びdeFonbruneによってアメーバの一種*Amoeba sphaeronucleus*で初めて成功した("Greffes Nuclearires Totale, Simple ou Multiple, Chez une Amibe," *Soc. Biol.* 130:744, 1939). 続いて1952年、Briggs及びKingが、殿様蛙の一種*Rana pipiens*で核移植に成功した("Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frog's Eggs", *Zoology* 38:455-463, 1952). Briggs及びKingが成功した核移植法は、

- 1) 受容用の卵母細胞以後、「受容卵母細胞」ともいうの活性化、
- 2) 除核、即ち受容卵母細胞からの染色体の除去又は不活性化、そして
- 3) 溶解された割球全体(即ち原腸胚形成に先立つ胚分割によって得られる細胞に由来する)を胚腔又は

早期原腸段階胚で移植、除核卵母細胞に戻す、事から成っている(上記文献参照)。

Elsdale他は、"A Description of the Technique for Nuclear Transplantation in *Xenopus laevis*", *J. Embryol. exp. Morph.* 8(4):437-1960(アフリカツメガエルにおける核移植技術に関する記載)で紫外線を照射して卵前核を不活性化しそして未受精卵母細胞を活性化している。アホロートル(*axolotl*)では、紫外線照射によって削減した卵核の染色体に電気ショックを与えると活性化する事が報告されている(Briggs, R., et al., "Transplantation of Nuclei of Various Cell Types from Neurulae of the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*)", *Develop. Biol.* 10:233, (1964)(メキシコサンショウウオの神経胚からの各種細胞の核移植)。核を含む溶解された割球全体をマイクロピペットの小口を通して除核卵母細胞へ移動させる方法が、これより核移動技術を経て共通に行われる。

マウスの核移植には2つの技術が用いられて来ている。Illmensee及びHoppeは全く外科的な手法を用い、マイクロピペットを原形質膜を経て前核段階胚の細胞質中に挿入し、核の除去及び挿入を行った。(Illmensee, K. and Hoppe, P.C., "Nuclear Transplantation in *Mus musculus* (マウスにおける核移植): Developmental Potential of Nuclei from Preimplantation Embryos (移植前胚からの核の発生の可能性)", *Cell* 23:9, 1981)。McGrath及びSolterは非分断的な核移植を報告した[McGrath, J. and Solter D., "Nuclear Transplantation in the Mouse Embryo by Microsurgery and Cell Fusion (顕微鏡手術及び細胞融合によるマウス胚における核移植)", *Science* 220:1300, 1983)。核は膜結合前核核体として胚の原形質膜迄浸透せずに単利された。そうして得られた核は、Sendaiウィルスを融合開始剤として使用して核融合によって受容用の細胞(以下、「受容用の」は単に「受容」とも略述する)に挿入された。少量のSe

ndaiウィルス懸濁液を、供与用の核(以下、「供与用の」は単に「供与」とも略述する)単離後吸引し、そしてウィルス懸濁液及び前核核体を連続して受容胚の胚腔に注入した。せいぜい、Illmensee及びHoppe(上記文献参照)の顕微鏡外科的方法是約30ないし40%の効率であり、一方McGrath及びSolter(上記文献参照)の非破壊的方法是90%以上の効率であった。これらの技術は、胚細胞段階の胚を製造するのに成功しているが、同段階の胚は妊娠迄は発達し続けない。Illmensee及びHoppeは3匹の生きたマウスを作ったという報告は疑問視されている。

その後核を除核前核接合体に移動させて、胚細胞段階の胚及びマウスが生ずるのは、供与細胞も又前核又は極く早期の2細胞段階にある時のみである事が報告された[McGrath, J. and Solter, D., "Inability of Mouse Blastomere Nuclei Transferred to Enucleated Zygotes to Support Development In Vitro", *Science* 226:1317-1319, 1984; Surani, M. A. H. et al., "Nuclei Transplantation in the Mouse: Heritable Difference Between Paatal Genomes after Activation of the Embryonic Genome (胚ゲノム活性化後における雄性ゲノム間の遺伝的な相違)", *Cell*, 45:127-136, 1986; and Robl, J. M. et al., "Nuclear Transplantation in Mouse Embryos: Assessment of Recipient Cell Stage (マウス胚における核移植: 受容細胞段階の調査)", *Biol. Preprod.* 34:733-739, 1986]。

最近羊での核移植法が報告された[Willadsen, S. M., "Nuclear Transplantation in sheep Embryos (ヒツジ胚における核移植)", *Nature* 320:63-65, 1986]。その中で活性化及び融合に誘電泳動を使用、そして受容体として中間II段階の卵母細胞を使用した事が記載されている。これらの実験の結果クローン仔羊が誕生した。しかし今日までウシでの核移植については、何も発表されて居ない。

#### 本発明の要約

かくして本発明の目的はウシ胚をクローン化する為の有用な方法を提供するにある。

本発明のもう一つの目的はウシ胚を核移植によってクローン化する方法を提供するにある。

本発明の更にもう一つの目的は、供与ウシ胚からの核を除核受容ウシ卵母細胞へ、核又は完全分割球を移植する為の方法を提供するにある。更にもう一つの目的は遺伝的に同一な牛を多数発生させる方法の使用に関する。

かくして、本発明に従う特定の態様のものとしては、

- (a) 受容用の卵母細胞から核染色体物質を除去することにより除核卵母細胞を形成する工程、
- (b) 供与用のウシ細胞を前記除核卵母細胞に隣接して置く工程、ならびに
- (c) 前記供与用の細胞と前記除核卵母細胞を電気的に融合させる工程、を含んでなる受容用の卵母細胞への供与用の細胞に由来する核の移植方法、が提供され

る。

これら及びその他の目的は以下の詳細な説明及び特許請求の範囲によってより明かになろう。

核移植法は、受容卵母細胞からの核分離、供与胚細胞の膜結合核の除核受容卵母細胞の卵胞腔中への導入、供与膜結合核及び除核受容卵母細胞それぞれの細胞質膜の配向、そして卵母細胞活性化そして供与膜結合核の除核受容卵母細胞中への融合の電気的誘発からなる。供与細胞又は核の除核ウシ卵母細胞への核移植を成功させるには、活性化における卵母細胞の条件及び活性化及び融合段階を実行する方法が重要である。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、核移植によるウシ胚クローン化の一連の操作段階に関する。本方法には受容卵母細胞から核を分離する非破壊的方法、供与胚から膜結合核の、供与細胞からの核の分離、又は割球（または分割球ともいう）それ自体の分離による単離が含まれる。供与核は次いで受容卵母細胞と結合され、電気的に誘導して細胞融合を行い、それによって核を供与胚細胞から受容細胞中に導入する。ウシ胚クローン化法は基本的には以下の5段階、即ち

- 1) 核移植に適当な受容胚又は卵母細胞の選択、
  - 2) 除核、即ち受容卵母細胞から核物質の分離、
  - 3) 供与胚の膜結合核の除核受容卵母細胞への導入、
  - 4) 供与膜結合核及び受容卵母細胞の細胞融合の為の配向、そして
  - 5) 電気泳動による供与核を囲む膜の受容卵母細胞膜への融合及び受容卵母細胞の活性化、
- からなる。

ここで示した方法全体は、多数の遺伝的に同一な胚、そしてそれは究極的には遺伝的に同一な動物を生産する為の核移植による胚（そして牛）のクローン化又は増殖法を示している。

ここで受容細胞として使用する卵母細胞は、生卵器から発生し、続いて減数分裂して成熟卵になる細胞を意味する。全ての卵母細胞が、等しく効率的なウシの核移植に最適な細胞ではない事が発見された。本発明の目的には、in vivo又はin vitroいずれかで成熟した中期II段階卵母細胞が最適である事が判った。成熟中期II段階卵母細胞は非過剰排卵又は過剰排卵した雌牛又は未産雌牛から発情後又はヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン（hCG）又は類似のホルモンを注射してから35ないし48時間後に外科的な手法によって集めることが出来る。あるいは又、未成熟卵母細胞を屠殺された雌牛又は未産雌牛から得られた卵巣卵胞から吸引して回収し、in vitroで適当なホルモン処理及び培養を行って成熟させる事が出来る。

供与細胞胚は外科的に回収した輸卵管からフラッシングによって又は公知の技術によって子宮から非外科的にフラッシングして得る事が出来る。供与胚の発生段階は2細胞ないし32細胞段階、即ち細胞分化が余り起こって

いない段階でなければならない。16ないし32細胞段階にある供与胚は胚（blastula）と言うよりはむしろ桑実胚（morula）と看做されている。それにも拘わらず、ここでは胚という用語が胚を指すのに使用され、割球または分割球（blastomere）という用語は原形形成前の胚から得られた単一細胞を指すのに用いられる。

供与細胞の核は、本発明の方法で、最適に使用できる様に膜が結合していなければならない。このような膜結合核は割球そのものからなるか、又は核体（karyoplast）からなっており、吸引して得られた核を含む細胞の小部分（subset）又は少量の原形質膜が結合した細胞質である。

ウシ細胞の顕微操作はMcGrath及びSolterの方法（上記文献参照）と同様に行った。同文献には顕微操作技術の詳細が述べられている。顕微操作は外径約120μm、内径約25ないし35ミクロンの細胞把持ピペット及び、外径が25ないし35ミクロンで先端を斜めに鋭く切った除核移植ピペットを用いて行う。成熟卵母細胞は最初に、7.5μg/ml濃度のサイトカラシンBで処理するか、又は作用が似ている微小管抑制剤を、除核移植ピペットを透明帯を経て挿入するのに十分な濃度で使用し、細胞質の一部を原形質膜が切断しないように分離する。成熟卵母細胞は最初細胞派把持ピペットで軽く吸引して把持する。次いで除核移植ピペットを卵母細胞の透明帯を経て中期II段階突起点又は第1極体の隣接点に、即ち中間染色体に隣接する位置に挿入する。ピペットは原形質膜には入らない様にする。ピペットを吸引し、細胞突起をピペット中に引き入れ、中期II段階突起の場合突起全体及び周辺の細胞質を、又は第1極体の場合、極体と周辺の細胞質をピペットに含ませる。この方法によって中期染色体全部をピペット内に吸引する様にする。ピペットをサクションで吸引しながら、原形質膜を引き伸ばし、そして密閉し反応能力のある原形質膜を除核卵母細胞上に残す。

供与胚は、移植ピペットの大きさによってサイトカラシンBで処理しても良いし又はしなくても良い。30ミクロン以下のピペットを使用する時は割球は裂断を避けるために処理することが薦められる。供与胚細胞の核は核を含む割球の一部を吸引し、そして核体を作るか、又は割球全体を吸引して移植する。細胞全体を吸引するのが好ましい。膜結合核を吸い込んだ移植ピペットは受容除核卵母細胞の透明帯を通して挿入され、そして膜結合核は、その膜が透明帯の下で受容卵母細胞の原形質膜に接する様にピペットから押し出される。膜結合核の除核受容卵母細胞への融合及び同時に行う受容卵母細胞の活性化は、市販されている。以下に述べるような電気融合装置を用いた単一の誘電泳動段階で実施する。供与胚核と除核受容卵母細胞との電気融合の前に細胞膜を電場中で配向させる事が必要である。ここで用いられる配向という用語の定義は、これら2個の細胞を、2個の膜即ち融

合する供与核含有体の原形質膜と受容卵母細胞の原形質膜との接触平面が電場に対して直角に成るように置く事である。配向を任意にすると融合成功率が著しく減少する事が分かった。もし細胞を融合膜が電場に対して平行になるように、又は略45°になるように配向させると、融合成功率は減少する。配向調整 (alignment) は電気的に又は機械的に行う。2個の細胞の不均衡が大きくなければ、小さな配向調整交流電圧 (1,000KHzで約5ボルト/ml) を短時間 (10秒) 負荷すれば、細胞を再配向させて膜を並置させられる。パルスを繰り返す場合が必要な場合もあり得る。もし細胞の大きさが大きく変わる時は機械的に操作して膜の配向を適宜行わなければならない場合もある。膜結合核の除核ウシ卵母細胞への挿入は、直流電流で、非電気伝導性、即ち非イオン性の細胞融合培地、例えばマンニトール溶液又はチンマーマン (Zimmerman) 細胞融合培地を用いた誘電泳動 (dielectrophoresis) によって行う。融合は細胞膜が破れ、適当に配向して互いに向き合っている2個の細胞の間に孔が出来て起こる。2個の細胞の間に形成された細孔即ち小さな通路は、通路の表面曲率が高く従って膜に大きな張力がかかる為熱力学的に不安定である。そして不安定である為に通路は合体し拡大し、2個の膜は単一細胞を形成する。

このようにして製造した単一細胞胚クローン体は *in vivo* 又は *in vitro* で桑実胚又は胎胚段階までの培養するのが好ましい。例えばクローン体は羊の輸卵管又は適当な培地中で培養する事が出来る。次いで胚はウシ又はその他の動物の子宮に、適当な発情段階で移植する事が出来る。移植の方法は公知であり、胚移植の分野で実際に行われている。これら移植体が子宮又はその代用体中で妊娠を開始するの1%である。これら妊娠が誕生する仔牛は供与細胞が単一胚又はそのクローン体と遺伝的に同一である。

以下の実施例は本発明を更に説明するものである。但し本発明はそれらに制限されない。

#### 実験法

##### 胚取得源

中期段階 (metaphase-stage) 卵母細胞及びそれより後期段階のウシ供与胚は発情開始後36ないし108時間で屠殺された非過剰排卵又は過剰排卵した雌牛又は未産雌牛の輸卵管から得た。これら動物はクロプロステノールナトリウム (cloprostenol sodium) ("Estrumate", Miles Laboratories社 (Shawnee Kansas USA) の登録商標) を2回注射 (合計2cc) して発情期を揃え、40mgのFSH-P (Schering Corp.社製 (Omaha, Nebraska, USA)) で4日間処理して過剰排卵させるのが好ましかった。核移植実験では受容体として *in vivo* 又は *in vitro* で成熟させた中期II段階受容卵母細胞そして供与体として2細胞ないし32細胞段階の胚を用いた。

胚ハンドリング及び顕微鏡操作

胚はBavister他 ["Development of Preimplantation Embryos of the Golden Hamster in a Defined Culture Medium (一定培地中でのゴールデンハムスターの移植前胚の発達)", *Biol. Reprod.*, 28:235, 1983] によりTL Hepes緩衝液改質のTyrodes培地中で回収し、操作した。胚は顕微鏡操作前の10分間及び操作中サイトカラシンB (7.5 $\mu$ g/ml濃度) を含む培地内に置いた。培地にはデミコルシンも添加した (0.1 $\mu$ g/ml)。ウシにおける細胞融合条件を試験する為に、少量の細胞原形質を受容卵母細胞から分離し、卵卵腔に再挿入した。核移植する為に、前核受容胚を最初、Wall他 ["Development of Porcine Ova that were Centrifuged to Permit Visualization of Pronuclei and Nuclei (遠心分離し前核及び核を見えるようにした豚卵の発達)", *Biol. Reprod.* 32:645, 1985] に従って15,00Gで3分間遠心分離し、前核を見えるようにした。

受容卵母細胞は口径25ないし35ミクロンの移植ピペットを用いて極体と並んだ細胞原形質の約1/2を吸引して除核し除核膜結合卵母細胞を残した。後期段階供与胚からの核は核とそれを囲む膜結合細胞原形質の一部を割球から吸引するか又は完全割球を吸引して分離した。顕微鏡操作は外径約120ミクロン、内径約30ミクロン、斜めに鋭利な切断した口を有する把持ピペット及び外径25ないし35ミクロンの移植ピペットを用いて行った。核を含む完全割球は供与胚から分離し、McGrath及びSolter (上述文献参照) の方法によって受容卵母細胞の卵卵腔に挿入した。

*In vitro* で発達を見た胚は、胚は寒天中に入れ、卵管-子宮接合部の上部に結紮したヒツジ輸卵管に移植した。移植5日後に胚を回収し、その発達状況を見た。発達能力を更に受容雌牛の移植した2個の胚についても試験した。

##### 細胞融合

2種類のウィルスを使用するウィルス細胞融合法及び電気融合法を、以上述べてきた方法によって調製された供与及び受容胚細胞の融合で試験した。Geles及びRuddle ["Production of Sendai Virus for cell fusion (細胞融合の為にセンダイウィルスの製造)", *In Vitro* 2:103, 1973] に従ってセンダイウィルスを培養した。センダイウィルスの力価はモルモット赤血球で試験した所、6,400ないし9,600赤血球凝集単位/mlであった。このウィルスと一緒に実施したマウス胚核移植実験では90%以上の融合率を与えた。その他にG. J. Letchworth [Letchworth and LaDue, "Bovine Herpes Mammillitis in Two New York Dairy Herds (2集団のニューヨーク酪牛におけるヘルペス乳頭炎)", *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 180:902, 1982] から得たウシヘルペスウィルス1 (NY1株) を試験した。ウシヘルペスウィルスは約10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mlの力価を有し、100倍濃縮された。このウィルスはウシの組織培養細胞では容易に細胞融合を起こす。両ウ

イルスはMcGrath及びSolterが述べている様に使用した(上述文献参照)。これら融合ウィルスを使用して細胞原形質を成熟ウシ胚に融合させようとしたが成功しなかった。従って以下に述べる融合は全て電気融合法を用いて行った。

2種類の培地、即ちTL Hepes培地及びZimmerman細胞融合培地(GCA Corporation社製、Chicago IL USA)についてその融合率を比較した。細胞融合後卵母細胞は5%の炭酸ガスを含む湿潤空気雰囲気の中で、流動パラフィン下150 $\mu$ lの改質Tyrodes煤質滴中に入れ、そして定期的に融合状況を調べた。無傷膜結合核の活性化及び除核卵母細胞への融合はチンマーマン細胞融合培地中、GCA Corporation社(Chicago, IL USA)製チンマーマン電気融合装置を使用した誘電泳動法によって実施した。融合室は、ガラススライド上間隔1mmの2個の平行電極からなる。装置は以下の様に調製する。

融合電圧:100-120ボルト(直流)

電圧間隔:1mm

配向調整電圧:1-5ボルト(交流)

配向調整振動数:1,000KHz

パルス期間:10-40マイクロセカンド

融合後配向調整時間:5秒

配向調整パルスは、ウシ細胞中の受容卵母細胞膜に隣\*

\*接して置いた割球又は核体が小さいと殆ど配向に成功しない事が分かった。それ故配向は大部分機械的に行った。膜結合核即ち割球又は核体と除核卵母細胞は、把持ピペットを使用して両者の配向を調整し、融合パルスが膜結合核の膜と除核卵母細胞膜との境界面を直角に流れるようにした。得られた胚は改質Tyrode培地50 $\mu$ l滴中で18ないし24時間in vitro培養し、次いで寒天塊中に入れ、受容母体例えば雌羊の結紮輸卵管に移植した。

#### 実施例 1

10 最初に細胞配向が融合率に及ぼす効果を2細胞マウス胚を用いて試験した。供与膜結合核及び卵母細胞は1,000KHz、5ボルト以下の交流パルスで配向した。配向に続いて細胞を100ボルトの直流融合パルスに20マイクロセカンド当てた。ウシ細胞融合では供与細胞が小さいと細胞に十分な極性を与えられず、交流パルスで方向調整が出来ないことが判った。それ故ウシ細胞は把持ピペットを使用して機械的に配向させた。

電気融合で検討した条件項目は、緩衝液の種類、パルス電圧、パルス期間、及び細胞配向性である。表1に挙げたように、電解質を含まないチンマーマン細胞融合培地(8/9;89%)が、TL Hepes(1/9;11%)より高い融合率を与えた。100ボルト及び120ボルトのパルス電圧の間には明確な差は認められなかった。

表 1

融合培地    パルス電圧    融合/全数    融合率(%)  
(40マイクロセカンド)

TL Hepes	100V	0/5	0
TL Hepes	120V	1/4	25
チンマーマン	100V	5/5	100
チンマーマン	120V	3/4	75

表2に示すように、20及び40マイクロセカンドのパルス期間は同等の融合率を与えたが、10マイクロセカンドは※

※それ程効果的ではなかった。

表 2

パルス電圧	パルス期間 マイクロ秒	融合／全数	融合率(%)
100V	40	14/18	78
100V	20	15/19	79
100V	10	2/10	20

## 実施例 2

前核を分離しそして再挿入した胚の発達をin vitroで検討し、核挿入ウシ胚の生存能力を試験した。核再挿入した29個の胚のうちの9個が7-ないし12-細胞迄発達したが、6個は4-ないし6-細胞迄であった。そしてそれ以外は、48時間のin vitro培養で1ないし3個の細胞にしかならなかった。

\* 次いで供与胚細胞の前核段階卵母細胞への核移行について検討した。下記の2箇所に示す表3は核移植体及び対照胚の、羊輸卵管で5日間発達させた後の発達情況を示している。対照胚は同じ日に雌牛から回収した胚であり、その多くは核移植胚の反対側の輸卵管に移植された。

表 3

供与核	受容細胞原形質	移行数	全回収数	空帯 (%)
前核	前核	71	38(54)	9(13)
対照		49	30(61)	0(0)
2, 4,				
8-細胞	前核	18	10(56)	3(17)
対照		23	19(83)	0(0)

	13 供与核	1-3細胞	4-6細胞	7-9細胞	10-16	14 桑実胚
		細胞	細胞	細胞	細胞	胚
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
前核	14(48)	3(10)	3(10)	2(7)	5(17)	
対照	12(40)	2(7)	2(7)	3(10)	11(37)	
2,4-						
8-細胞	7(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
対照	8(42)	1(5)	1(5)	1(5)	8(42)	

(%は羊輸卵管から回収された無傷胚の数を基準にしている。)

対照胚は前核ないしは8-細胞段階のものであって、必ずしも核移植胚と同段階には無かった。それ故細胞段階での直接比較は出来なかった。しかし、対照群は屠殺動物から回収後生存しそして発達した胚が実験質に運ばれ室温で数時間そのまま維持出来る事を示した。核を分離しそして再挿入した前核胚も羊輸卵管中で桑実胚あるいは細胞に発達した。前核再挿入から発達した胚の中の2個は受容雌牛に移植され、正常な仔牛が生まれた。前核を、2-、4-、または8-細胞胚で置換した胚は卵割を1回または2回迄しか行わなかった。

全部の胚を寒天中に入れたが、大部分が寒天被覆による保護状態が得られなかった。しかし対照胚は無傷で回収され、移植、顕微操作した胚の約15%が透明帯が空洞であった。

これらの実験から核は前核ウシ細胞及びうまく挿入された核物質から分離出来る事が結論付けられた。核細胞と受容卵母細胞との間の細胞融合は非イオンの培地中で可能であり、もし供与細胞と受容卵母細胞との膜境界面が融合電気パルスの方角に対して直角に向けられるならば最適化となった。

### 実施例 3

本実施例では供与細胞を、発情後2ないし5日後に屠殺して得た4-ないし32-細胞段階の胚から選んだ。受容卵母細胞は、屠殺して得た卵子をCritser他["Influence of Cumulus Cell Association During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes on Embryonic Development (ウシ卵母細胞のin vitro成熟間に胚発達に及ぼす卵細胞会合状態の影響)", Biol. of Reprod. 34: Suppl. 1, P. 192 (Abstract No. 286), 1986] によって、in vitroで22ないし26時間成熟させるか、又は発情後36時間後に屠殺して回収した卵母細胞をin vivoで成熟させて得た1-5mmの卵胞から吸引した。受容卵母細胞は卵丘を、1\*50

\*mg/mlのウシこうがんヒアルロニダーゼを含むTALP-Hepes緩衝培地中で10分間攪拌して分離した。

上記した方法で、成熟卵母細胞を除核し、ある場合は極体とそれに隣接する細胞原形質だけを分離するか、又他の場合には細胞原形質の約半分を分離する。除核及び核移植は4.5μg/ml濃度のサイトカラシンB中で行った。核を有する供与卵割球は、供与胚から吸引し、除核受容卵母細胞の卵卵腔に注入した。細胞活性化及び融合はチンマーマン細胞融合培地中で誘電泳動で、上記した方法に従って行った。融合した胚は、寒天塊に埋め込む前に、改質Tyrode培地中で16ないし18時間培養し、そして雌羊の結紮輸卵管に移植した。

In vivoで5日間培養してから、胚を回収し評価した。その結果、受容卵母細胞が約半分の細胞原形質を伴って分離され、供与割球が4-ないし16-細胞胚の場合、融合効率が上昇することが判った。この受容/供与組み合わせによる融合効率は342例中237例で成功し、融合率は69%であった。桑実胚又は細胞胚in vivoで発達させた場合の融合効率は受容卵母細胞をいずれの方法で調整してもあまり変わらなかった(3.7%及び1.9%)。しかし、桑実胚又は細胞胚の発達は、原形質を約半分分離した場合でもin vitroで成熟させた卵母細胞(1.9%)と比較してin vivo成熟卵母細胞(27%)の方が良かった。明らかにin vitro成熟卵母細胞は正常に発達出来るようにうまく適切に成熟しない。桑実胚又は細胞胚発達した胚は発達が正常の様である。桑実胚又は細胞胚段階胚の14個が非外科的に、適当な発情段階でウシの子宮に、通常行われている胚移植によって移植された。4個の胚が受胎され、その内3個が母牛の胎内で成育した。2個から正常な仔牛が誕生した。残りの2個は妊娠25日目及び90日目に流産した。

本実施例から4-ないし16-細胞供与胚細胞を受容卵母細胞に移植するのが生存可能な胚を作り出す事になり、ひいては仔牛の誕生につながる事が明らかになっ

た。こうした結果は核移植が、遺伝的に同一な胚を増殖させ、多数の遺伝的に同一な仔牛を生産する事が可能である事を示唆している。

以上本発明を幾分詳細に述べたが、これをある程度変えたりあるいは改質しても、それらが本発明の特許請求の範囲の中にあるのは明白である。

---

フロントページの続き

(72)発明者    ランデル・エス・ブラザー  
                  アメリカ合衆国 Wisconsin 州 53711  
                  マジソン・シュレーダーロードアパート  
                  メント 7 6725

(72)発明者    フランク・バーンズ  
                  アメリカ合衆国 Wisconsin 州 53719  
                  マジソン・パークエツジドライブ 6905

(72)発明者    ジェイムズ・エム・ロブル  
                  アメリカ合衆国 Massachusetts 州 01007  
                  ベルチャータウン・ブランディワイン  
                  9

(56)参考文献    Theriogenology, vol. 1, 25 (1) (1986) P189  
                  Nature vol. 320 (1986)  
                  P63~65